

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**FISIOLOGIA**

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE A  
ESTRUTURA E O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR  
OVARIANO DE RATAS ADULTAS**

Dissertação de Mestrado

Rosana Maria Frey

Porto Alegre

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**FISIOLOGIA**

**EFEITO DA ESTIMULAÇÃO NEONATAL SOBRE A  
ESTRUTURA E O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR  
OVARIANO DE RATAS ADULTAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas : Fisiologia.

**Rosana Maria Frey**

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto

Co-Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Porto Alegre

2007

**“À Minha Família”**

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor **Dr. Gilberto Luiz Sanvitto** pela oportunidade concedida, pela orientação, pela confiança e pela compreensão. Muito obrigada!

Ao Professor **Dr. Aldo Bolten Lucion** pela oportunidade, confiança e exemplo de profissionalismo.

À Professora **Dra. Janete A. Anselmo-Franci** da USP-Ribeirão Preto, por disponibilizar seu laboratório para realização de alguns experimentos e, também, pelo apoio teórico que muito contribuiu para a elaboração desse trabalho.

Ao doutorando **Marcelo Picinin Bernuci** da USP-Ribeirão Preto, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e disposição em responder a todos os meus inúmeros e-mails, pelo interesse e sugestões enriquecedoras nesse trabalho. Muito obrigada por tudo!

Aos Professores **Dra. Márcia Giovenardi** e **Dr. Alberto A. Rasia-Filho** pelo exemplo de profissionalismo, incentivo e sabedoria, pelos maravilhosos ensinamentos ao longo da minha trajetória de aprendizado científico e pessoal. Márcia, tu continuas sendo minha ídola.

À Professora **Dra. Maria Flávia Marques Ribeiro** pelos valiosos ensinamentos na disciplina de Prática de Ensino e pelo exemplo de professora que és.

À Professora **Dra. Ilma Simoni Brum da Silva** pela oportunidade e confiança concedidas no meu estágio didático.

Aos meus magníficos amigos e colegas de laboratório: **Charlis, Anelise, Márcia, Ana Raquel, Fabiana, Natália, Caroline, Lígia, Maiara, Vanise, Tiago, Bruno, Tatiane, Rosane, Silvana, Ana Lúcia e Camila**, pelos excelentes momentos vividos durante esse período, pelo carinho e apoio sempre demonstrados. A todos, meu muitíssimo obrigado pela convivência agradável e pelo acolhimento.

Aos amigos **Osni Gonçalves** e **Marcelo Alves de Souza**, cuja amizade sincera e companheirismo incondicional me fazem pensar que na vida, a dádiva mais preciosa que podemos conquistar é a amizade. Muito obrigada pela liberdade de podermos conversar sobre tudo e pela parceria, valeu!

À **Cármem Marilei Gomes** pela amizade e exemplo de pessoa que és, pelos enriquecedores ensinamentos, pela ajuda e pela colaboração em todos os momentos desse trabalho.

Às amigas e companheiras de apartamento **Ívi e Lolita**, que estiveram sempre ao meu lado em todos os momentos, muito obrigada pela linda amizade que construímos e que será eterna!

Ao meu namorado **Felipe** pelo amor, dedicação, carinho e respeito à minha individualidade, pela paciência em todos os nossos momentos vividos. Eu te admiro e te amo muito!

Aos meus pais **Liane** e **Carlos Roberto**, exemplos de honestidade, força, bravura, respeito, perseverança e amor, por serem meu porto seguro e pelo apoio incondicional em todas as fases da minha vida. A vocês toda minha admiração, orgulho e minha eterna gratidão.

Às minhas irmãs **Denise** e **Ana Cláudia** pelo carinho, amizade, orgulho, parceria e, principalmente, pela paciência em conviver comigo. Eu amo vocês!

À bioterista **Ângela** pelo cuidado com os animais, sem os quais não seria possível a realização desse trabalho.

Aos Animais pelo sacrifício em favor do desenvolvimento científico.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

**“Enquanto a cor de pele dos homens for mais importante que o brilho dos olhos, haverá guerra.”**

Bob Marley

**“A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las.”**

Aristóteles

## SUMÁRIO

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE ABREVIATURAS

### RESUMO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 Manipulação neonatal.....	01
1.2 Manipulação neonatal e reprodução.....	03
1.3 A rata como modelo experimental.....	04
1.4 O ciclo estral da rata.....	05
1.5 A foliculogênese.....	07
<b>2. OBJETIVO</b> .....	09
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	09
3.1 Animais.....	09
3.2 Grupos.....	10
3.3 Análise do ciclo estral.....	11
3.4 Peso ovariano.....	13
3.5 Análise morfológica dos ovários.....	13
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	15
<b>5. RESULTADOS</b> .....	17
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	24
6.1 Desenvolvimento folicular ovariano.....	24

6.2 Manipulação neonatal e reprodução.....	28
6.3 Dinâmica folicular e múltiplas interações.....	29
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>34</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>35</b>

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Modelo de manipulação neonatal.....	11
<b>Figura 2:</b> Coleta de secreção vaginal.....	12
<b>Figura 3:</b> Células coletadas por meio de esfregaço vaginal nas diferentes fases do ciclo estral da rata.....	13
<b>Figura 4:</b> Aspecto morfológico de ovário de rata não-manipulada.....	16
<b>Figura 5:</b> Média do peso dos ovários coletados de ratas não-manipuladas e manipuladas.....	17
<b>Figura 6:</b> Média do número total de folículos antrais por ovário coletado de ratas não-manipuladas e manipuladas.....	18
<b>Figura 7:</b> Média do número de folículos antrais normais e de folículos antrais atrésicos por ovário coletado de ratas não-manipuladas e manipuladas.....	19
<b>Figura 8:</b> Distribuição do número de folículos antrais normais classificados por diâmetro por ovário coletado de ratas não-manipuladas e manipuladas.....	20

**Figura 9:** Distribuição do número de folículos antrais atrésicos classificados por diâmetro por ovário coletado de ratas não-manipuladas e manipuladas.....21

**Figura 10:** Média da espessura da teca de folículos antrais normais por ovário coletado de ratas não-manipuladas e manipuladas.....22

**Figura 11:** Média da espessura da teca de folículos antrais atrésicos por ovário coletado de ratas não-manipuladas e manipuladas.....23

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**CRH** - Hormônio Liberador de Corticotrofina

**FSH** - Hormônio Folículo Estimulante

**FSHR** - Receptor do Hormônio Folículo Estimulante

**HPA** - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

**LH** - Hormônio Luteinizante

**LHRH** - Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante

**NGF** - Fator de Crescimento Neural

**NA** - Noradrenalina

**ODC** - Ornitina Descarboxilase

**PRL** - Prolactina

**RIE** - Radioimunoensaio

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**TH** - Tirosina Hidroxilase

**VIP** - Polipeptídeo Intestinal Vasoativo

**VE** - Valerato de Estradiol

## RESUMO

A manipulação no período neonatal tem sido utilizada há algumas décadas como modelo experimental para analisar os mecanismos pelos quais variações precoces no ambiente do animal afetam o desenvolvimento de sistemas neurais, dando origem a alterações comportamentais e neuroendócrinas estáveis na vida adulta. Em ratos, a manipulação neonatal consiste do manuseio suave dos filhotes por alguns minutos, em geral durante as duas primeiras semanas de vida. Trabalhos prévios demonstram que a manipulação neonatal altera o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, reduzindo a capacidade reprodutiva de fêmeas através da diminuição do comportamento sexual, do bloqueio da ovulação e promove um atraso na instalação da puberdade.

Com isso, o objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos da manipulação neonatal sobre a função ovariana de ratas. Animais foram submetidos à manipulação neonatal durante 1 minuto, nos dez primeiros dias de vida pós-natal, e após três ciclos estrais regulares os ovários foram retirados, na fase do proestro, para análise histológica dos mesmos.

A análise estrutural dos ovários das ratas manipuladas mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa no peso ovariano, no número total de folículos antrais por ovário e nos diferentes diâmetros da espessura da camada das células da teca de folículos antrais normais e atrésicos. A manipulação neonatal induziu aumento do número de folículos antrais normais por ovário, redução no número de folículos antrais atrésicos por ovário, aumento do número

de folículos antrais normais com diâmetros inferiores a 300  $\mu\text{m}$  e uma diminuição do número de folículos antrais atrésicos com diâmetros entre 401-500  $\mu\text{m}$ .

Em conjunto, nossos resultados demonstraram que a manipulação neonatal não induz alterações no desenvolvimento morfológico folicular e que, os mecanismos que levam a redução da capacidade reprodutiva de fêmeas provocada pela manipulação neonatal, como o bloqueio da ovulação, já visto em trabalhos do nosso laboratório, não estão associados a alterações de estrutura ovariana.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Manipulação neonatal

Os mecanismos neurais envolvidos no desenvolvimento de determinados comportamentos são regulados por interações genéticas e ambientais. Portanto, uma experiência sensorial no início da vida pós-natal pode afetar o desenvolvimento neural e o comportamento de um animal adulto. Dentre as influências ambientais que podem modificar o desenvolvimento neural estão os vários tipos de estímulos estressantes que atuam sobre o organismo em desenvolvimento (GONZÁLES et al, 1990).

As duas primeiras semanas após o nascimento representam um período crítico para o desenvolvimento neural em ratos. Processos vitais como migração, divisão, diferenciação, crescimento e morte de células ocorrem no sistema nervoso nesse período (MISTRETTA; BRADLEY, 1978).

Em ratos, a estimulação neonatal tipicamente consiste da “manipulação” dos filhotes por alguns minutos, em geral, durante os primeiros 10 dias de vida. Esse procedimento aparentemente não nocivo ao indivíduo tem como consequência na vida adulta uma série de alterações comportamentais e endócrinas que se caracterizam basicamente por uma diminuição do medo a ambientes novos. Além disso, sabe-se que esses animais quando adultos têm uma resposta menos acentuada da secreção de glicocorticóides pela supra-renal, quando expostos a estímulos estressores. Ou seja, ratos estimulados na infância apresentam uma secreção de corticosterona menor frente a novos estímulos

estressantes (LEVINE, 1993; MEANEY et al, 1993). Porém, os níveis basais de corticosterona de animais manipulados e não manipulados não diferem entre si quando adultos. As diferenças entre eles parecem ser devidas a uma sensibilidade diferencial do Sistema Nervoso Central ao mecanismo de retroalimentação negativa da supra-renal (LEVINE, 1994).

A principal característica da fase de desenvolvimento pós-natal do sistema de estresse, no rato, é o chamado período hiporresponsivo ao estresse. Essa fase ocorre a partir do dia 4 ao dia 14 pós-natal, e durante esse período, tanto as estimulações aparentemente inofensivas como a manipulação, quanto os estímulos estressores como frio e choque elétrico, induzem alterações comportamentais e endócrinas na vida adulta (LEVINE, 1994). As respostas ao estresse classicamente conhecidas incluem a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que provoca a liberação do hormônio liberador de corticotrofina pelo núcleo paraventricular, de corticotrofina pela hipófise anterior e de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (FRANCIS et al, 1996). A resposta endócrina ao estresse é um importante mecanismo homeostático e a secreção de glicocorticóides pelo córtex adrenal é a característica central dessa resposta (RHEES et al, 2001). A separação maternal dos neonatos de suas mães durante o desenvolvimento neonatal altera o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e as respostas ao estresse (RHEES et al, 2001).

A ampla distribuição do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no Sistema Nervoso Central (SNC) sugere que esse peptídeo atue não só estimulando o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), mas também como um neurotransmissor em regiões extra-hipotalâmicas, as quais estão envolvidas nas

respostas do organismo a estímulos estressantes, como o núcleo central da amígdala, hipocampo, córtex cerebelar e locus coeruleus (BLOOM et al, 1982; KAWATA et al, 1982; BUGON et al, 1982).

Gonzáles et al. (1994), sugerem que a manipulação neonatal afetaria não apenas o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (LIU et al, 1997; PLOTSKY e MEANEY, 1993), mas também o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Também foi demonstrado que tanto o estresse pré-natal (WARD, 1994) quanto à estimulação neonatal (LUCION et al, 1997) pode diminuir o comportamento sexual em machos e fêmeas.

Devido às dificuldades inerentes à complexidade dos mecanismos que controlam as variações hormonais cíclicas em fêmeas, a maioria dos estudos sobre mecanismos fisiológicos em geral é realizada em animais machos. O modo tônico de liberação da testosterona facilita o entendimento dos mecanismos fisiológicos em machos. Ao contrário, para se estudar o organismo feminino é necessário o acompanhamento das fases do ciclo estral. Essa complexidade e conseqüentes dificuldades contribuem para o pouco esclarecimento sobre os eventos fisiológicos que controlam a reprodução nas fêmeas (ANSELMO-FRANCI et al, 1999).

## **1.2 Manipulação neonatal e reprodução**

Trabalhos em nosso laboratório têm demonstrado que a manipulação neonatal além de causar ciclos anovulatórios (GOMES et al, 1999) causa um aumento do conteúdo do hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH) na área pré-óptica medial (APOM), diminuição da secreção de hormônio luteinizante

(LH), prolactina (PRL) (GOMES et al, 2005) e estradiol na tarde da fase proestro do ciclo estral de ratas. Essa redução na concentração de estradiol pode estar alterando o mecanismo de retroalimentação positiva responsável pelo controle da secreção de LHRH e LH e, portanto, promovendo a redução da capacidade reprodutiva desses animais; já que o pico pré-ovulatório de estradiol representa um sinal permissivo e essencial para o processo ovulatório (CHAPPELL; LEVINE, 2000; GONZÁLES et al, 2000).

Com isso, os mecanismos endócrinos envolvidos com os processos reprodutivos femininos desde a instalação da puberdade até a execução do comportamento sexual, que é observado através do índice de lordose executada pela fêmea sobre o comportamento de monta apresentado pelo macho, são influenciados pela estimulação neonatal ou pela separação maternal. Mas, independente da origem precisa (manipulação neonatal ou separação maternal), a presença de alterações comportamentais e neuroendócrinas induzidas por estimulação sensorial neonatal que se manifestam durante a puberdade (SIECK; RAMALEY, 1975) e vida adulta, também podem influenciar a preservação da espécie através de mudanças no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

### **1.3 A rata como modelo experimental**

Grande parte do conhecimento que possuímos, até o presente, sobre o controle do ciclo ovariano de mamíferos, cuja ovulação é espontânea, se deve aos resultados de estudos realizados sobre o ciclo estral das ratas (FREEMAN, 1994). A rata é um animal não sazonal e constitui um bom modelo experimental por

apresentar ovulação espontânea e um perfil de variações de gonadotrofinas e esteróides gonadais bastante semelhante ao da mulher, além de ter um ciclo estral de curta duração, ser um animal de pequeno porte e de fácil manutenção.

#### **1.4 O ciclo estral da rata**

O ciclo estral da rata é composto por quatro fases que além de expressarem mudanças na mucosa vaginal com a presença de células nucleadas, leucócitos e células cornificadas em cada período (MATTHEWS; KENYON, 1984), exibem variações nas concentrações hormonais de esteróides gonadais e conseqüentemente de gonadotrofinas. Também, associada a essas mudanças cíclicas é possível observar alterações comportamentais. Por exemplo, a noite do proestro é o período no qual a fêmea apresenta o “desejo sexual”, isto é, ela está pronta para o coito, o proestro dura de 12 a 14 horas e precede o estro. O estro dura de 25 a 27 horas, e é durante esse período, mais precisamente, durante a madrugada do estro que ocorre a ovulação. Se não há concepção, após o estro existe um período de recuperação, denominado metaestro ou diestro I, cuja duração é de 6 a 8 horas, seguido pelo diestro II que dura de 55 a 57 horas, onde se reinicia a secreção de hormônios ovarianos para o próximo ciclo (FREEMAN, 1994).

Os esteróides gonadais secretados durante o ciclo estral têm função essencial na modulação dos processos relacionados à reprodução em fêmeas. Eles atuam no hipotálamo, hipófise e ovários para coordenar a secreção cíclica de gonadotrofinas e, portanto, a ovulação (CONNELLY, 2001; HERBISON, 1998). De

fato, a ovulação requer picos de gonadotrofinas e prolactina no período pré-ovulatório (ANSELMO-FRANCI et al, 1997; ISHIKAWA, 1992; SCHWARTZ, 2000).

A variação das concentrações dos esteróides gonadais funciona como um gatilho para a cascata de eventos que induzem o pico pré-ovulatório desses hormônios (CONNELLY, 2001; ISHIKAWA, 1992; SCHWARTZ, 2000). O estradiol, um dos esteróides gonadais, apresenta uma baixa concentração plasmática entre o estro e a manhã do metaestro, e começa a aumentar na tarde dessa fase, alcançando valores mais altos ao redor do meio dia do proestro, caindo no fim da tarde até atingir os valores basais no início da madrugada do estro. Enquanto que a concentração plasmática de progesterona, outro esteróide gonadal, começa a aumentar quase simultaneamente com o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), atinge o pico juntamente com ele e retorna a valores basais na manhã do estro. Um segundo pico de progesterona inicia ao meio dia do metaestro, mantendo-se na madrugada do diestro e caindo para valores basais no início da manhã (BUTCHER et al, 1974; SMITH et al, 1975; FREEMAN, 1994).

Conforme Smith et al. (1975), o padrão de secreção da prolactina, do LH e do hormônio folículo estimulante (FSH) é similar durante a maior parte do ciclo estral. As concentrações desses hormônios permanecem baixas e não são modificadas até à tarde e início da noite do proestro. As concentrações plasmáticas de FSH e de prolactina, diferente do LH, apresentam um novo aumento no estro (pico secundário) (SZAWKA; ANSELMO-FRANCI, 2004). O aumento do FSH no plasma durante o estro ocorre no período da manhã, e esse pico secundário de FSH é necessário para o recrutamento de folículos para o próximo ciclo, pois o recrutamento folicular foi bloqueado quando o pico

secundário de FSH foi impedido. Já o pico secundário de prolactina ocorre na tarde do estro e pode estar relacionado à função luteotrófica (SZAWKA; ANSELMO-FRANCI, 2004).

### **1.5 A foliculogênese**

Devido aos trabalhos realizados em ratas que grande parte dos achados recentes sobre os mecanismos que regem a foliculogênese existe. Tanto o recrutamento folicular quanto à seleção do folículo dominante é muito similar entre os primatas e roedores, com exceção de que nos roedores, múltiplos folículos tornam-se dominantes durante cada ciclo estral. Além disso, diferentemente dos roedores, cujos folículos primordiais só são formados nos três primeiros dias após o nascimento, no ovário humano, esses folículos já estão presentes desde a vigésima semana de vida fetal (HIRSHFIELD, 1991).

A determinação do número total de folículos no ovário da maioria dos mamíferos é determinada no período fetal, corroborando com o dogma central da biologia reprodutiva, de que as fêmeas nascem com um número finito de células germinativas e que regridem sem reposição ao longo da vida pós-natal. No entanto, estudos recentes têm mostrado que o mesmo parece não ocorrer em roedores, uma vez que foi demonstrada a existência, no ovário, de células germinativas com capacidade de proliferação e diferenciação celular, capazes de sustentar a produção de folículos e oócitos na vida pós-natal de camundongos (JOHNSON et al, 2004).

Atualmente tem-se evidenciado que alguns neurotransmissores como a noradrenalina (NA) e o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e também os fatores de crescimento neural (NGF) estão bastante envolvidos com os processos que regem a foliculogênese em mamíferos, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento folicular, independente de gonadotrofinas (DISSEN et al, 2002)

Juntamente com esses fatores de crescimento neural, os neurotransmissores noradrenalina e VIP estão também envolvidos na fase mais tardia do desenvolvimento folicular, quando os folículos passam a ser responsivos a ação das gonadotrofinas. Por mecanismos ainda pouco esclarecidos, esses neurotransmissores parecem ser os principais responsáveis pela expressão de receptores para gonadotrofinas, principalmente do receptor para o hormônio folículo estimulante (FSHR) nos folículos em desenvolvimento (MAYERHOFER et al, 1997; ROMERO et al, 2002).

Ainda que muitos dos estudos sobre os métodos que regem a foliculogênese ainda sejam controversos, de uma forma geral, esses processos são influenciados por fatores intra e extracelulares ainda pouco conhecidos. Sabe-se que os folículos primordiais iniciam um processo dinâmico de diferenciação e proliferação celular (recrutamento inicial) que garante a formação de *pools* de folículos aptos a serem recrutados ciclicamente pelas gonadotrofinas e que culminam com a formação de folículos ovulatórios (MCGEE; HSUEH, 2000).

## **2. OBJETIVO**

O presente trabalho tem por objetivo estudar os efeitos da manipulação neonatal sobre a função ovariana de ratas Wistar adultas. A hipótese formulada é de que as alterações reprodutivas observadas nas fêmeas manipuladas possam ser causadas por uma alteração estrutural do ovário secundária a essa manipulação. Para testarmos essa hipótese, as gônadas foram analisadas através de abordagens morfológica e estrutural, utilizando uma análise histopatológica do ovário na fase do proestro do ciclo estral de ratas manipuladas e não-manipuladas.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Foram utilizadas 20 ratas Wistar prenhas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Essas ratas tiveram o momento do parto controlado rigorosamente. No dia seguinte ao nascimento, as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes; aos 22 dias de vida os animais foram desmamados e as fêmeas foram mantidas em caixas, com no máximo 5 ratas cada até a idade adulta. Todos os animais foram mantidos em uma sala com ciclo claro-escuro de 12/12 horas com início da fase escura às 18 horas, com temperatura mantida em torno de 24<sup>o</sup> C e com livre acesso à água e comida.

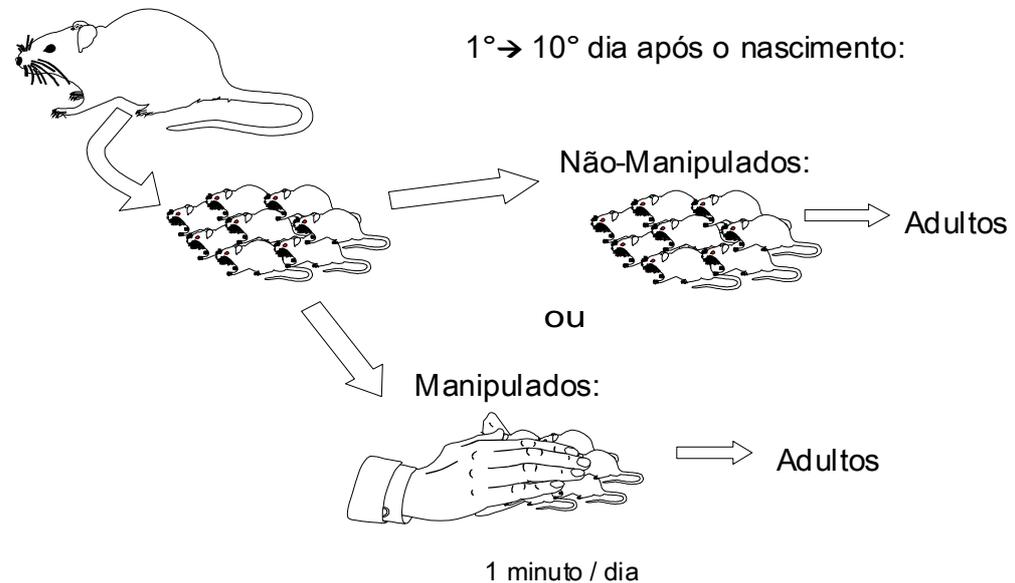
### 3.2 Grupos

Os animais foram divididos em dois grupos:

**Não-manipulados (controle):** animais que não receberam nenhum tipo de manipulação até o dia 10 após o nascimento. Depois disso, as caixas eram limpas conforme a rotina do biotério. Número de animais= 15.

**Manipulados:** animais que foram brevemente manipulados durante 1 minuto por dia, durante os 10 primeiros dias de vida. A manipulação consistiu em levar a ninhada para uma sala anexa ao biotério, com o mesmo fotoperíodo e temperatura, separar os filhotes da mãe, que foi mantida em uma caixa ao lado, e manipulá-los utilizando-se luvas látex finas, todos juntos, acima do ninho, gentilmente. Após essa manipulação todos os filhotes foram devolvidos ao mesmo tempo ao ninho, logo sendo recolocada a mãe. Os procedimentos de manipulação iniciaram no dia seguinte ao nascimento dos filhotes (Dia1). Número de animais=15.

A figura 1 mostra de forma esquemática o procedimento de estimulação neonatal utilizado nesse experimento.



**Figura 1:** Modelo de manipulação neonatal

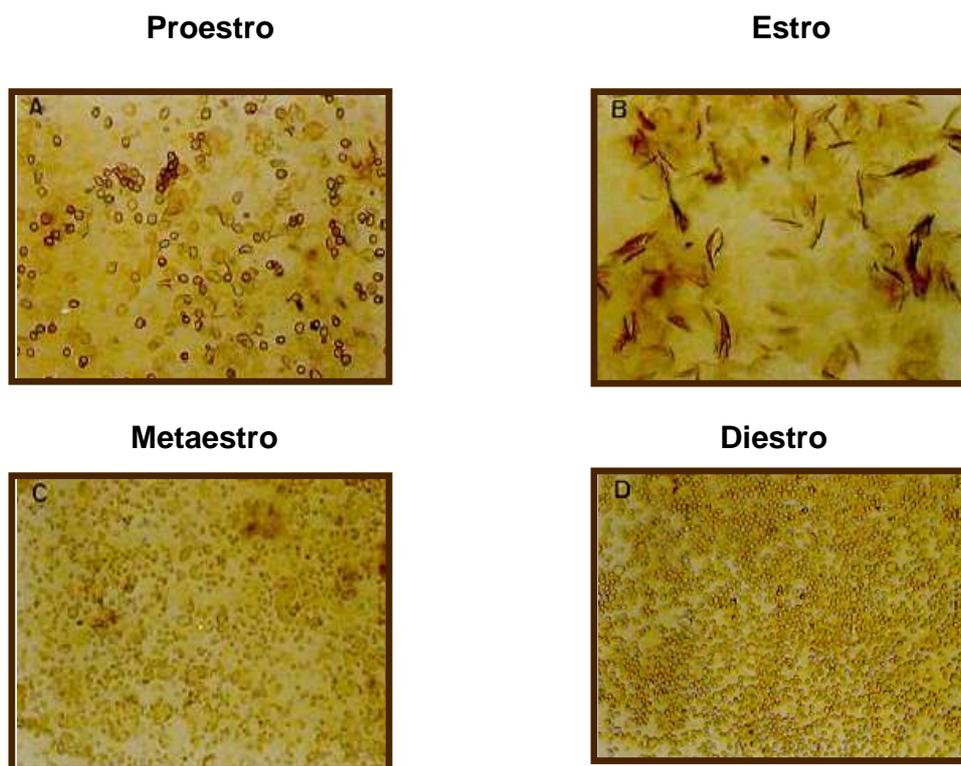
O procedimento de manipulação neonatal utilizado foi o mesmo descrito em trabalhos clássicos sobre estimulação por manipulação (DENENBERG, 1964; HESS et al, 1969).

### 3.3 Análise do ciclo estral

A coleta da secreção vaginal (figura 2) foi realizada diariamente às 10 horas da manhã, em ratas com idade a partir de 65 dias. O esfregaço vaginal foi coletado e analisado a fresco no microscópio óptico (figura3). Foram utilizadas no experimento somente ratas que apresentaram no mínimo três ciclos estrais regulares.



**Figura 2:** Coleta de secreção vaginal



**Figura 3:** Células coletadas por meio de esfregaço vaginal nas diferentes fases do ciclo estral da rata.

### 3.4 Peso ovariano

Fêmeas adultas Wistar foram decapitadas para coleta dos ovários. Após a retirada, os ovários foram isolados do tecido adiposo adjacente e pesados em uma balança de precisão.

### 3.5 Análise morfológica do ovário

Este experimento teve por objetivo realizar uma análise de diferentes parâmetros estruturais ovarianos. Os ovários fixados em paraformaldeído 10%

foram impregnados em parafina para análise histológica. Foram realizados cortes seriados de 8µm de espessura em um micrótomo e corados com hematoxilina e eosina. Utilizando um microscópio óptico associado a um sistema de imagens, foram analisados, a cada corte (figura 4), os seguintes parâmetros de acordo com os critérios apresentados por Lara et. al (2000):

a) Contagem do número de folículos por ovário:

a.1) Número de folículos antrais normais: definidos como aqueles que apresentam uma cavidade antral bem definida contendo um oócito com um núcleo.

a.2) Número de folículos antrais atrésicos: aqueles que apresentam células da granulosa em processo degenerativo e muitas vezes com aparente degeneração oocitária.

b) Medida do diâmetro folicular:

b.1) Tamanho de folículos antrais saudáveis e atrésicos: a análise morfométrica do diâmetro de cada folículo antral e atrésico foi realizada através do uso de um sistema de análise de imagem digital.

c) Avaliação da espessura da camada das células da teca

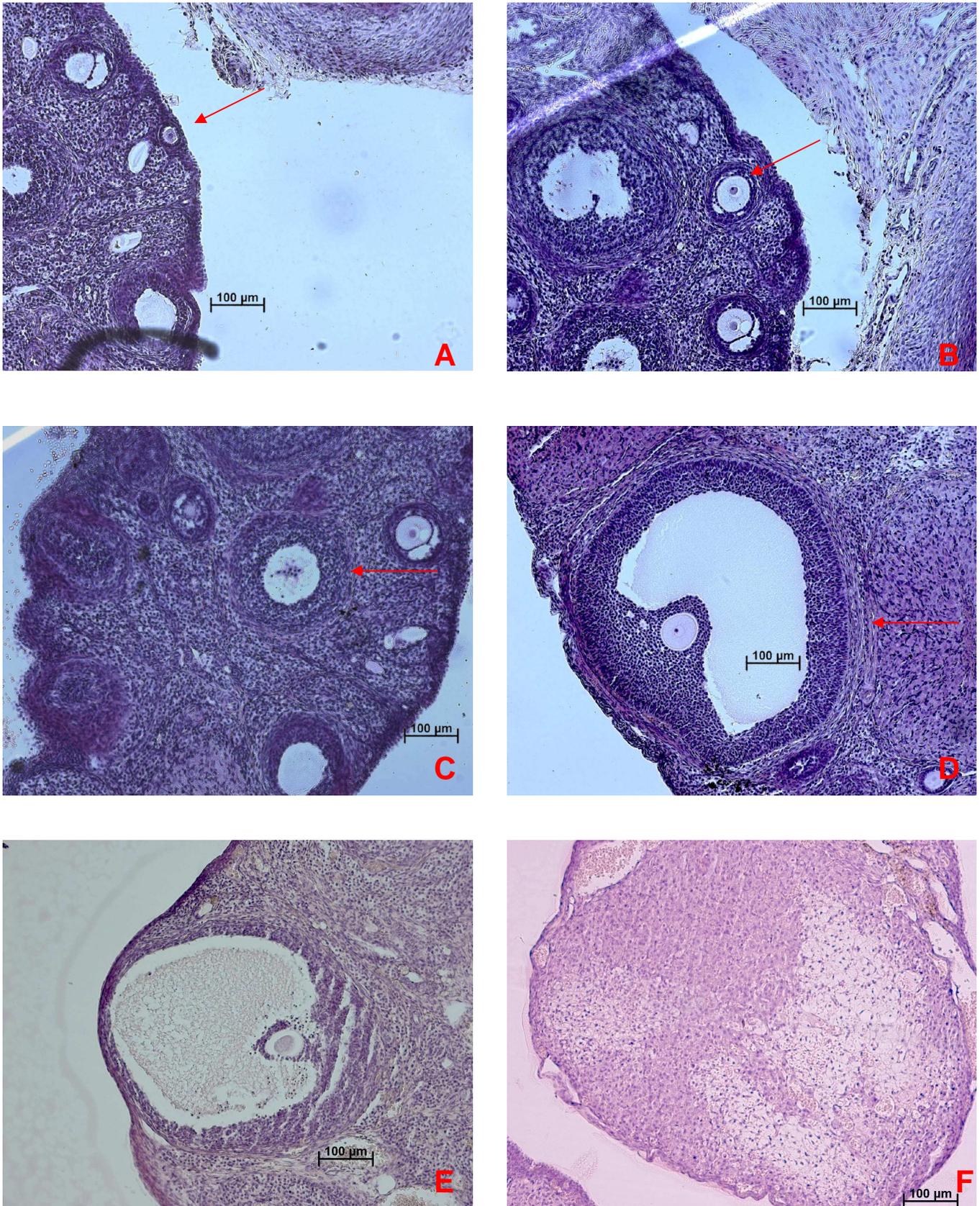
d) Avaliação de uma possível disfunção ovariana através da avaliação da incidência de cistos foliculares:

d.1) Cistos: folículos com ampla cavidade antral, delgada camada de células da granulosa e hipertrofia tecal.

d.2) Folículos tipo III: definidos como grandes, destituído de oócito, contém de 4 a 5 camadas de pequenas e densas células granulosas circundando um grande antro e com compartimento tecal normal.

#### **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os diferentes dados desse experimento são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças foram analisadas através do Teste t de Student. O nível crítico foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ) para se admitir uma diferença de valores como estatisticamente significantes.

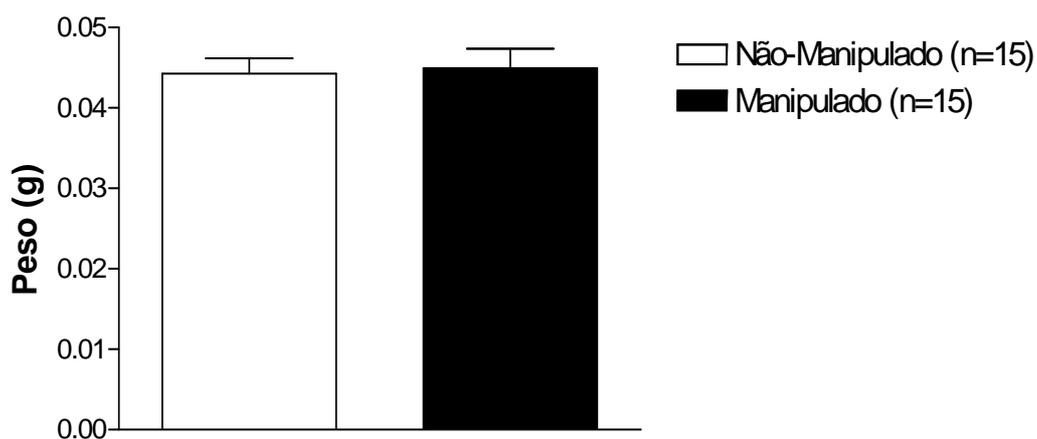


**Figura 4:** Aspecto morfológico de ovário de rata não-manipulada. (A) Folículo primário saudável, (B) Folículo secundário saudável, (C) Folículo secundário atrésico, (D) Folículo antral saudável, (E) Folículo antral atrésico, (F) Corpo Lúteo. 10 x.

## 5. RESULTADOS

### Peso ovariano

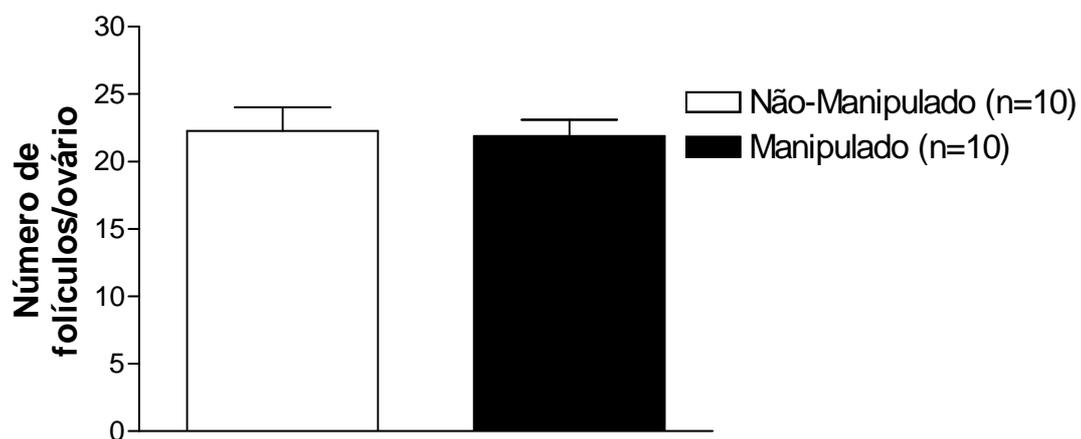
Fêmeas manipuladas e não-manipuladas não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao peso dos ovários coletados (Figura 5).



**Figura 5:** Peso dos ovários coletados de ratas não-manipuladas e manipuladas durante os dez primeiros dias de vida pós-natal. Número de animais = 15 ( $p > 0,05$  Teste  $t$  de Student)

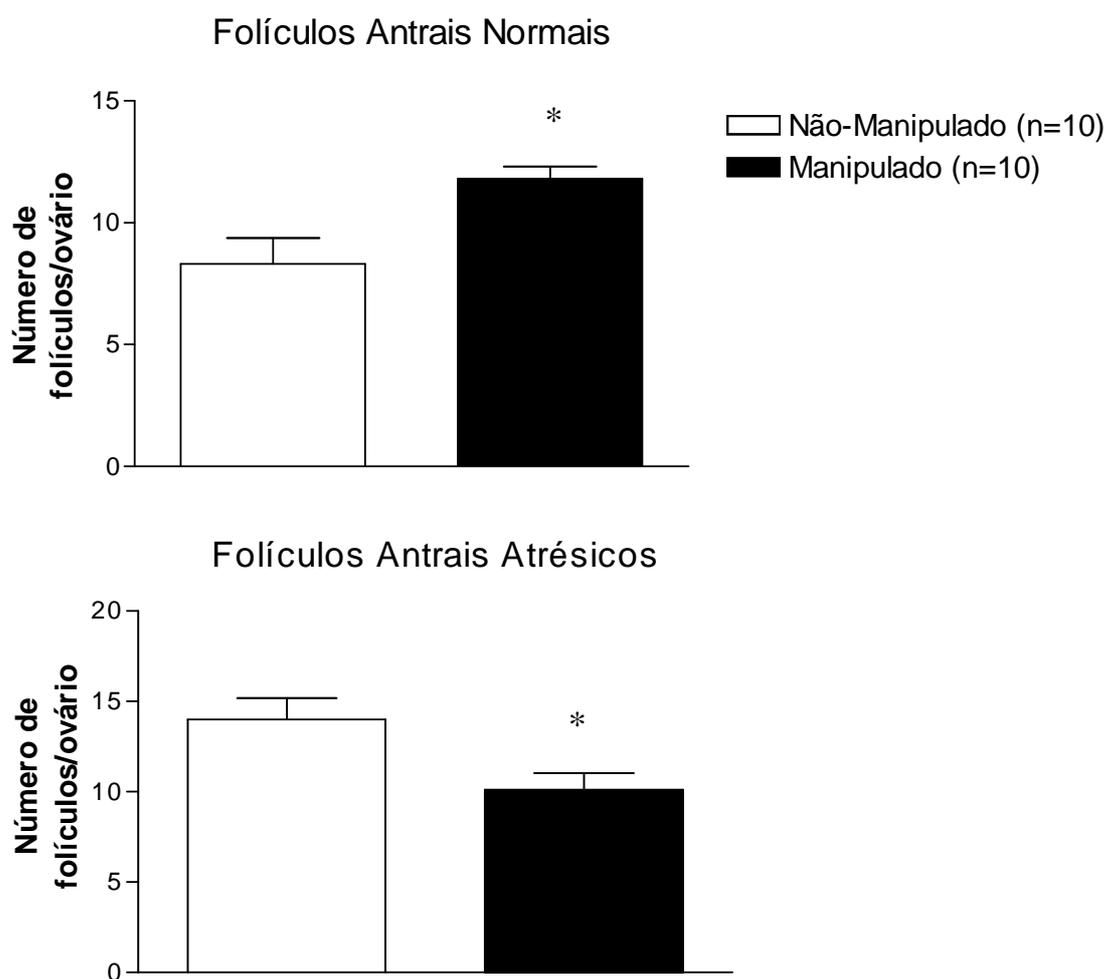
### Análise morfológica do ovário

O número de folículos antrais totais, folículos antrais normais mais folículos antrais atrésicos, quantificados nos ovários dos animais dos grupos manipulados e não-manipulados não foi diferente entre os grupos estudados (figura 6).



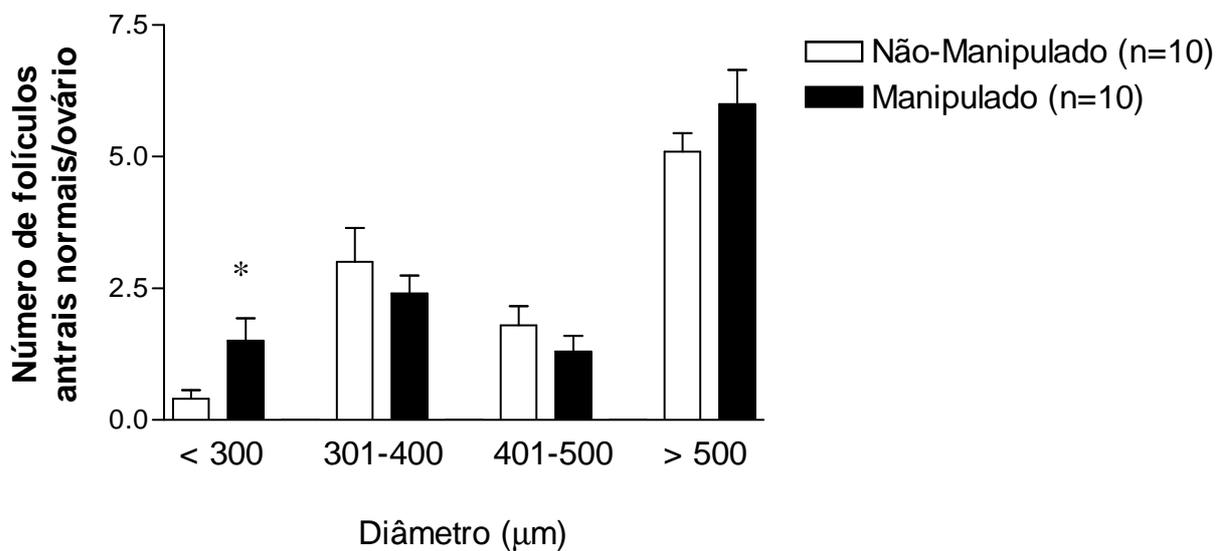
**Figura 6:** Número total de folículos, antrais normais mais antrais atrésicos encontrados no ovário direito de ratas do grupo não-manipulado e manipulado. Número de animais = 10 ( $p > 0,05$  Teste  $t$  de Student).

O número de folículos antrais normais encontrados nos ovários dos animais do grupo manipulado foi significativamente maior ao encontrado nas ratas do grupo não-manipulado. O número de folículos antrais atrésicos quantificados nos ovários dos animais do grupo manipulado foi significativamente menor ao encontrado nas ratas do grupo não-manipulado (figura 7).



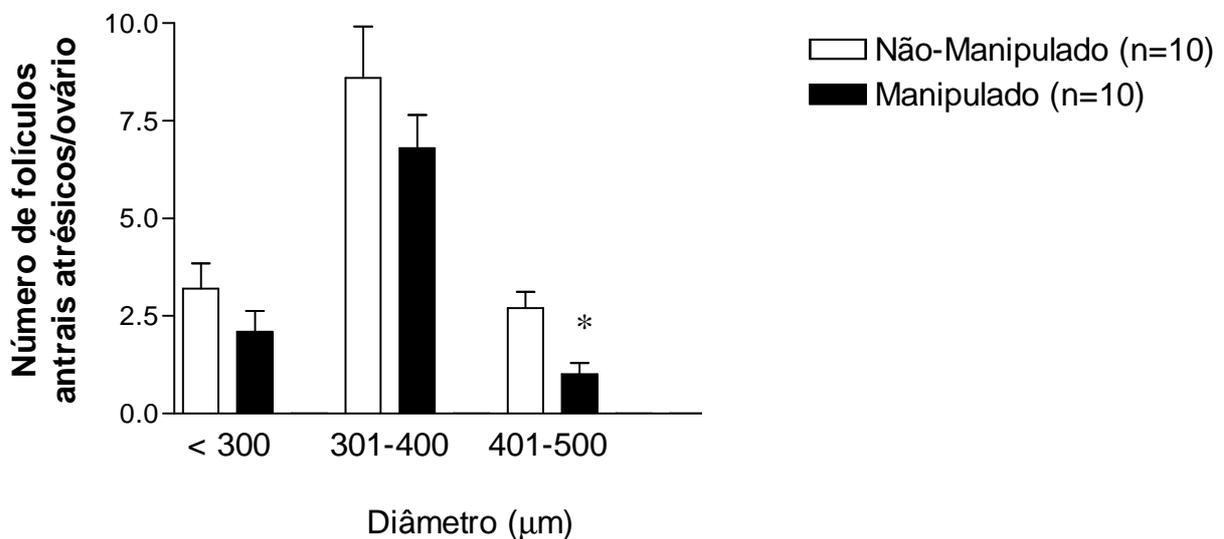
**Figura 7:** Número de folículos antrais normais e número de folículos antrais atrésicos encontrados no ovário direito de ratas do grupo não-manipulado e manipulado. Número de animais = 10. \* Comparado ao grupo não-manipulado ( $p < 0,05$  Teste *t* de Student).

A análise da distribuição dos folículos antrais normais por tamanho mostrou que a manipulação neonatal não alterou significativamente o número de folículos antrais normais com tamanhos entre 301-400  $\mu\text{m}$ , com tamanhos entre 401-500  $\mu\text{m}$  nem folículos com superiores a 500  $\mu\text{m}$ , mas aumentou o número de folículos antrais normais com diâmetros inferiores a 300  $\mu\text{m}$  (figura 8).



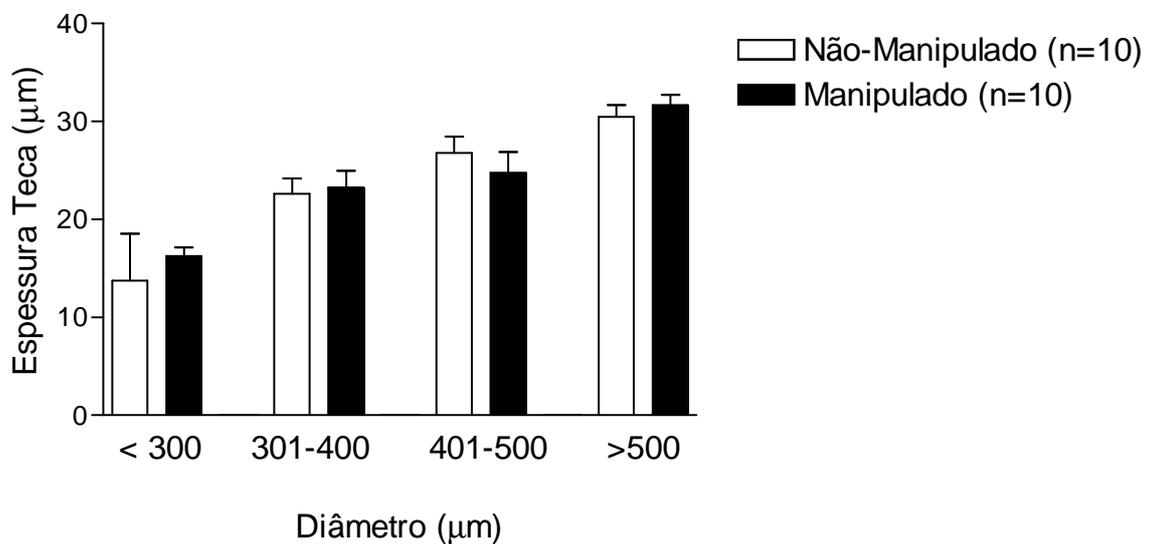
**Figura 8:** Distribuição do número de folículos antrais normais por diâmetro no ovário direito de ratas do grupo não-manipulado e manipulado. Número de animais = 10. \* Comparado ao grupo não-manipulado ( $p < 0,05$  Teste  $t$  de Student).

A análise da distribuição dos folículos antrais atresicos por tamanho mostrou que a manipulação neonatal não alterou significativamente o número de folículos antrais atresicos com tamanhos inferiores a 300  $\mu\text{m}$  e com tamanhos entre 301-400  $\mu\text{m}$ , mas diminuiu o número de folículos antrais atresicos com diâmetros entre 401-500  $\mu\text{m}$  (figura 9).



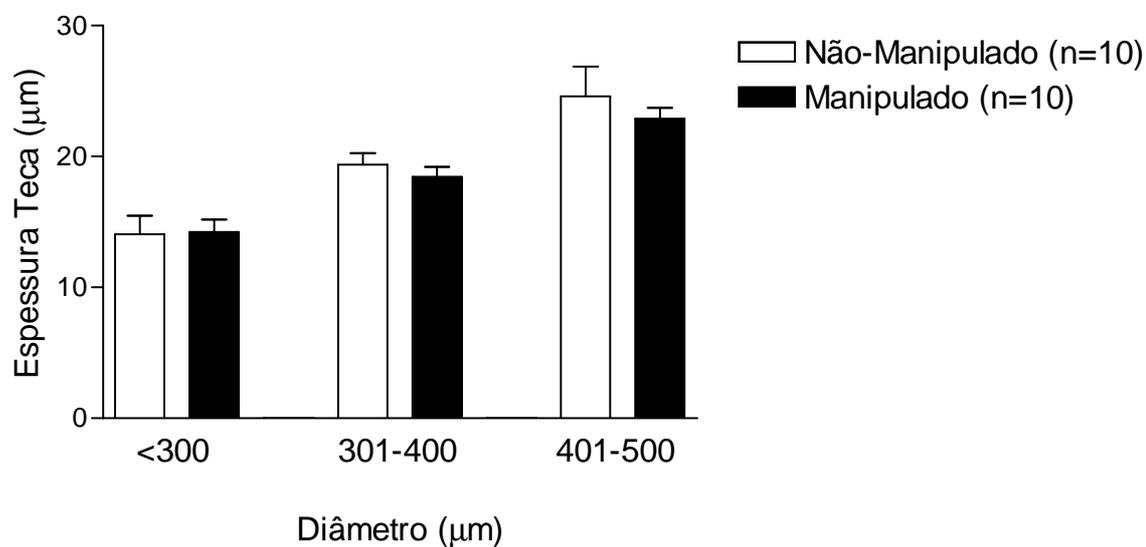
**Figura 9:** Distribuição do número de folículos antrais atresicos por diâmetro no ovário direito de ratas do grupo não-manipulado e manipulado. Número de animais = 10. \* Comparado ao grupo não-manipulado ( $p < 0,05$  Teste  $t$  de Student).

A análise da espessura da camada de células da teca de folículos antrais normais distribuídos por tamanho mostrou que não houve diferença significativa entre os animais dos grupos manipulados e não-manipulados (figura 10).



**Figura 10:** Espessura da teca de folículos antrais normais distribuídos por diâmetro no ovário direito de ratas do grupo não-manipulado e manipulado. Número de animais = 10 ( $p > 0,05$  Teste  $t$  de Student).

A análise da espessura da camada de células da teca de folículos antrais atresicos distribuídos por tamanho mostrou que não houve diferença significativa entre os animais dos grupos manipulados e não-manipulados (figura 11).



**Figura 11:** Espessura da teca de folículos antrais atresicos distribuídos por diâmetro no ovário direito de ratas do grupo não-manipulado e manipulado. Número de animais = 10 ( $p > 0,05$  Teste  $t$  de Student).

## 6. DISCUSSÃO

Considerando os resultados deste estudo, a manipulação neonatal promoveu um aumento significativo de folículos ovarianos antrais normais e não induziu a formação de cistos ovarianos. Apesar de estudos em nosso laboratório provarem que a manipulação neonatal reduz a capacidade reprodutiva de fêmeas através da diminuição do comportamento sexual, do atraso na instalação da puberdade e do bloqueio da ovulação, nossos resultados mostraram que não houve alterações no desenvolvimento folicular morfológico nos ovários dessas ratas manipuladas. O mecanismo de liberação dos folículos pré-ovulatórios do ovário encontrar-se reduzido, parece estar relacionado a alterações hormonais decorrentes da manipulação neonatal, mas não no seu processo de crescimento e maturação.

### 6.1 Desenvolvimento folicular ovariano

A análise dos ovários mostra que a morfologia está preservada, porém a manipulação neonatal causa alterações quantitativas no desenvolvimento folicular ovariano, como um significativo aumento no número de folículos antrais normais e uma diminuição no número de folículos antrais atrésicos, bem como um significativo aumento de folículos antrais normais de tamanho inferior a 300  $\mu\text{m}$  de diâmetro e uma diminuição de folículos antrais atrésicos com tamanhos entre 401-500  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

É bem sabido que a função ovariana é regulada por sinais hormonais e intraovarianos que agem em sincronia para controlar o desenvolvimento folicular, a secreção de esteróides e a ovulação. Evidências indicam que a inervação simpática ovariana também contribui para esse processo regulatório facilitando tanto o desenvolvimento folicular (LARA et al, 1990) como a esteroidogênese ovariana (ADASHI, 1981).

Dorfman et al. (2003), utilizando estresse por frio, encontraram significativa queda no número de folículos pré-antrais normais bem como acúmulo de folículos antrais com hipertrofia das células da teca, diferentemente dos nossos resultados já que não encontramos as células da teca hipertrofiadas, porém não constataram a queda do número de óvulos nem a instalação do quadro de ovários policísticos. Segundo esses autores, essas anormalidades se devem a um aumento na liberação de noradrenalina que ocorre logo após três semanas de experimento e conseqüente acúmulo do fator de crescimento neural (NGF) e de noradrenalina encontrados na quarta semana de estresse por frio.

Aceitando a capacidade do estresse por frio em promover tanto acúmulo de NGF quanto de noradrenalina no ovário (DORFMAN et al, 2003), é possível que a diminuição no número de folículos pré-antrais normais e acúmulo de folículos antrais, como mostrado esse acúmulo de folículos antrais nesse trabalho em ratas manipuladas (figura 7), seja devido a uma aceleração do processo de recrutamento folicular, decorrentes de altas concentrações de noradrenalina e NGF. Do mesmo modo, a capacidade do NGF em estimular a proliferação e diferenciação das células da teca (DISSEN et al, 2000) pode

explicar o acúmulo de folículos antrais com hipertrofia tecal encontrados unicamente nos ovários dos animais submetidos ao estresse por frio.

Lara et al. (1993) mostraram que cistos ovarianos induzidos pela administração de uma única dose intramuscular de valerato de estradiol (VE) é resultado de alterações na homeostasia de catecolaminas ovarianas, que se iniciam antes mesmo do desenvolvimento dos cistos. Lara et al. (2000) sugerem que essas alterações incluem aumentos no conteúdo e liberação de noradrenalina dos terminais nervosos do ovário e que, foi verificado após o aumento da liberação de noradrenalina desses terminais, um acréscimo de síntese intraovariana de NGF bem como de seu receptor, p75 NGFR, responsável possivelmente pela manutenção desses terminais, como visto pela capacidade do NGF em aumentar a atividade da enzima tirosina hidroxilase (TH), enzima limitante para a produção de noradrenalina.

Paredes et al. (1998), utilizando uma combinação de estresses (restrição e frio) demonstraram que irregularidades do ciclo estral ocorrem simultaneamente à formação de folículos antrais anômalos com alta capacidade de secreção de esteróides ovarianos. Da mesma forma, o aparecimento de folículos anômalos e acúmulo de folículos antrais causados pela exposição crônica ao NGF são os principais responsáveis pelo acréscimo dos níveis plasmáticos de estradiol e conseqüente alteração da ritmicidade do ciclo estral (DISSEN et al, 2000).

Nossos resultados mostram uma tendência ao aumento de folículos antrais saudáveis com mais de 500  $\mu\text{m}$  de diâmetro (pré-ovulatórios) nas ratas manipuladas, que pode indicar uma deficiência na liberação dos mesmos. Esses dados podem inferir na possibilidade desses folículos (> 500  $\mu\text{m}$  de

diâmetro) não expressarem receptores para FSH e LH, bloqueando dessa forma sua ruptura e subsequente ovulação, uma vez que a ovulação depende do mecanismo de retroalimentação positiva que os esteróides gonadais exercem sobre o eixo hipotálamo-hipófise (FREEMAN, 1994; HERBISON, 1998). Tendências a aumentos nas concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol foram encontradas nas ratas tratadas cronicamente com NGF, o que foi também correlacionado com o aumento no número de folículos antrais (DISSEN et al, 2000). Igualmente, tanto a noradrenalina quanto o NGF são capazes de estimular a síntese de receptores para FSH e LH nos folículos ovarianos, facilitando dessa forma a ação das gonadotrofinas sobre as enzimas envolvidas na esteroidogênese (MAYERHOFER et al, 1997; ROMERO et al, 2002).

Lara et al. (1990), trataram ratas com anticorpos para NGF, no período neonatal, e demonstraram que ocorreu uma diminuição do número de folículos antrais normais com diâmetro maior que 450  $\mu\text{m}$ , com um concomitante aumento dos folículos antrais pequenos (menores que 300  $\mu\text{m}$ ) dessas ratas. Segundo esses autores, essa redução do número de folículos antrais largos achados nas ratas tratadas com NGF sugere que a inervação simpática ovariana é muito importante para o desenvolvimento folicular. O aumento do número dos folículos antrais pequenos, como mostrado nesse trabalho em ratas manipuladas (figura 8), pode ser tanto pelo aumento do recrutamento e/ou pelo interrompimento do desenvolvimento folicular desse estágio. Catecolaminas parecem exercer parte desse efeito facilitatório na função folicular pelo aumento do efeito estimulatório de gonadotrofinas. É bem

conhecido que catecolaminas e gonadotrofinas juntas estimulam a secreção de esteróides pelas células da teca e da granulosa (ADASHI, 1981).

## **6.2 Manipulação neonatal e reprodução**

Além da estimulação neonatal alterar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal como mostrado por Liu et al. (1997), Meaney et al. (1985), Meaney et al. (1994), que focaram os eventos relacionados ao estresse, os resultados levaram a conclusão que a estimulação poderia afetar sistemas neurais que modulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, como observado através do aumento da população de receptores para glicocorticóides no hipocampo e córtex frontal. Do mesmo modo, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal poderia ser alterado pela estimulação neonatal. Esse evento no início da vida pós-natal poderia afetar sistemas neuromoduladores que estão associados funcionalmente às ações dos esteróides gonadais em nível central, já que periféricamente parece não ocorrer alterações, como verificado através da presença de um ciclo estral regular mostrado por Gomes et al. (1999) e através da presença de folículos aptos a serem ovulados, como mostrado nesse trabalho, em ratas manipuladas.

No período pré-ovulatório existe o aumento na secreção de esteróides gonadais, que possuem função crucial na regulação de diversos mecanismos do sistema reprodutivo da fêmea, incluindo a receptividade sexual e a ovulação. Para coordenar a liberação cíclica de gonadotrofinas e a atividade ovulatória, esses hormônios exercem suas ações atuando sobre o hipotálamo, hipófise e ovários (CONNELY, 2001; MAHESH; BRANN, 1998). No proestro,

existe também um aumento na secreção do hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH), do hormônio luteinizante (LH), do hormônio folículo estimulante (FSH) e de prolactina que atuam em conjunto, possibilitando dessa forma o evento da ovulação na madrugada da fase seguinte, o estro (FREEMAN, 1994).

### **6.3 Dinâmica folicular e múltiplas interações**

Concentrações basais de FSH são observadas desde a manhã do estro até a tarde do proestro, quando ocorre o pico pré-ovulatório. Na madrugada do estro ocorre um pico secundário de FSH, cuja função parece estar relacionada ao recrutamento de folículos destinados a crescerem e, provavelmente, serem ovulados no próximo ciclo. Esse pico secundário de FSH é estimulado pelo estradiol aumentado do proestro (HIRSHFIELD; MIDGLEY, 1978).

O crescimento do folículo pré-ovulatório é dependente da interação do estradiol, FSH e LH. O FSH liga-se a seus receptores nas células da granulosa dos folículos antrais pequenos e estimula a produção de estradiol pela indução ou aumento da aromatase, enzima que catalisa a biossíntese do estradiol a partir dos andrógenos. O aumento da produção de andrógenos, pelas células da teca, leva ao aumento da concentração de estradiol folicular, esse estradiol passa a exercer o papel regulador, pois ele aumenta a habilidade do FSH em estimular o AMPc, que por sua vez tem uma maior capacidade de se ligar aos seus sítios aumentando a atividade da aromatase, consecutivamente aumentando o número de receptores de LH e aumentando a responsividade ao LH como também ao FSH (RICHARDS, 1980).

Dados não publicados do nosso laboratório mostram que existe um aumento significativo de FSH plasmático na madrugada do estro em ratas manipuladas. Concomitantemente, podemos inferir que o fato das ratas manipuladas, desse experimento, apresentarem um acúmulo no número de folículos antrais normais, possa ser devido a esse aumento de FSH no estro, uma vez que o pico secundário de FSH está relacionado ao recrutamento de folículos destinados a serem ovulados no próximo ciclo (HIRSHFIELD; MIDGLEY, 1978).

Por outro lado, Gomes et al. (2005), mostraram que o estradiol está reduzido no plasma de ratas manipuladas durante o proestro, podendo dessa forma alterar a secreção de FSH no estro. Conforme nossos resultados, foi demonstrado um aumento significativo de folículos antrais normais nas ratas manipuladas, sugerimos que poderia existir uma alteração na síntese do complexo enzimático aromatase, que converte uma significativa porção de androstenediona e testosterona em estradiol, nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios. Essa provável alteração da aromatase poderia ser a causa dessa redução de estradiol plasmático durante o proestro, uma vez que o estradiol, através do mecanismo de retroalimentação positiva, pode influenciar a ocorrência da secreção de LHRH que estimula a secreção de gonadotrofinas necessárias para a ovulação.

O controle do pico secundário de FSH ainda não está totalmente elucidado, embora esteja bem estabelecido que ele não depende do LHRH, mas sim do pico de LH induzido pela queda dos níveis plasmáticos de inibina. Além disso, a administração de progesterona aumenta as concentrações

plasmáticas de FSH na madrugada do estro em ratos que tenham o pico pré-ovulatório de LH bloqueado (WATANABE et al, 1990).

A ação estimulatória da progesterona na secreção de FSH pode ser exercida tanto diretamente por níveis hipofisários, quanto indiretamente através da inibição da produção ovariana de inibina. A primeira possibilidade é constatada pelo fato de que a liberação de FSH basal e a máxima resposta do FSH ao LHRH em culturas de células adeno-hipofisárias são estimuladas pela progesterona (DROUIN; LABRIE, 1981).

Tébar et al. (1997) sugerem que a secreção de progesterona na tarde do proestro, induzida pelo pico de LH, não está envolvida com a queda da síntese e secreção de inibina ovariana, mas pode regular a liberação do FSH do estro pela estimulação da produção de ativina. O peptídeo ativina estimula a expressão para os receptores de FSH (FSHR), e os níveis circulantes de FSH são aumentados pela ação da ativina (MINEGISHI, 2004).

É amplamente aceito que gonadotrofinas regulam direta ou indiretamente a expressão de muitas proteínas no ovário, incluindo fatores de crescimento, enzimas e fatores de transcrição que podem induzir múltiplas cascatas de sinalização (RICHARDS, 2001). Bastida et al. (2005) mostraram que o aumento da atividade da enzima ornitina descarboxilase (ODC) no ovário em diferentes estágios de desenvolvimento folicular apontam um importante papel na fisiologia ovariana de ratas. Em fêmeas adultas, o pico pré-ovulatório de ODC que segue o pico de LH na noite do proestro parece estar relacionado à capacidade de secreção de progesterona pelo corpo lúteo, que é necessária para o sucesso da implantação e do desenvolvimento do ovócito. Bastida et al. (2005), utilizando anticorpos para ODC através de imunistoquímica, indicaram

que, em ovários de ratas, a presença de ODC nas células da teca e da granulosa dos folículos antrais pode sugerir a hipótese de que a indução de ODC na noite do proestro pode ser necessária para a luteinização das células da teca e da granulosa de um folículo ovulatório.

Como mostrado por Gomes et al. (2005), o grupo manipulado não apresenta o pico pré-ovulatório de LH no proestro. Com isso, podemos sugerir que as ratas manipuladas deste experimento também possam não apresentar ativação suficiente de ODC, que segue o pico de LH, podendo ser uma das hipóteses de ratas manipuladas apresentarem ciclos anovulatórios, uma vez que mostramos uma tendência ao aumento de folículos antrais saudáveis maiores que 500  $\mu\text{m}$  de diâmetro em ratas manipuladas.

Na tentativa de esclarecermos nossa dúvida sobre as ratas manipuladas desse estudo apresentarem a morfologia ovariana preservada, porém um bloqueio da ovulação, a tendência seja acreditarmos em um problema de regulação central nessas ratas. Gomes et al. (2005), pela técnica de *punch*, encontraram no grupo manipulado um aumento significativo do conteúdo de LHRH na Área Pré-Óptica Medial (MPOA), na tarde do proestro, podendo representar uma deficiência na sua liberação, bloqueando assim o pico pré-ovulatório de LH e FSH e a ovulação.

Considerando que a principal função da gônada feminina é promover a liberação de um oócito viável à fertilização e garantir o sucesso da propagação da espécie, que o processo de crescimento e maturação dos folículos ovarianos e a ovulação são eventos críticos da função reprodutiva feminina, qualquer fator que interfira no funcionamento desses eventos podem prejudicar o sucesso reprodutivo. Assim, os resultados demonstrados nesse estudo

indicam que a manipulação neonatal causa alterações quantitativas no desenvolvimento folicular ovariano, como um significativo aumento no número de folículos antrais normais e uma diminuição no número de folículos antrais atresícos, contudo a morfologia ovariana se mantém preservada nessas ratas quando adultas. Possivelmente uma falha na estimulação ovariana decorrente da manipulação neonatal parece estar envolvida no mecanismo de expulsão do óvulo do ovário, mas não na sua produção.

O ciclo reprodutivo de uma fêmea é decorrente de uma série de acontecimentos que incluem a ovulação, a cópula, a fertilização, a prenhez, o parto e a capacidade de cuidar dos filhotes (SCHWARTZ, 2000). Deste modo, mais estudos são necessários para o esclarecimento completo dos efeitos da manipulação neonatal sobre a reprodução e os mecanismos envolvidos na redução da função reprodutiva em ratas submetidas à manipulação neonatal.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- a manipulação neonatal induziu alterações quantitativas no desenvolvimento folicular ovariano, como observado no aumento do número de folículos antrais, diminuição no número de folículos antrais atrésicos, aumento do número de folículos antrais normais com diâmetros inferiores a 300  $\mu\text{m}$  e na diminuição do número de folículos antrais atrésicos com diâmetros entre 401-500  $\mu\text{m}$ ;
- a manipulação neonatal não induziu alterações morfológicas no desenvolvimento folicular;
- os mecanismos que levam a redução da capacidade reprodutiva de fêmeas provocada pela manipulação neonatal, como o bloqueio da ovulação, já visto em trabalhos do nosso laboratório, não estão associados a alterações de morfologia ovariana.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adashi EY, Hsueh AJW. Stimulation of  $\beta_2$ -adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* 108: 2170-2178, 1981.

Anselmo-Franci JA, Franci CR, Krulich L, Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Locus Coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Brain Research* 767: 289-296, 1997.

Anselmo-Franci JA, Franci CR, Lucion AB, Sanvitto G. Projeto Temático – FAPESP – Sistema reprodutor feminino: Controle neuroendócrino e efeitos do estresse. P. 1-28, 1999.

Bastida CM, Cremades A, Castells MT, López-Contreras AJ, López-García C, Tejada F, Peñafiel R. Influence of ovarian ornithine decarboxylase in folliculogenesis and luteinization. *Endocrinology* 146: 666-674, 2005.

Bloom FE, Battenberg EL, Rivier J, Vale W. Corticotropin releasing factor (CRF) immunoreactive neurons and fibres in rat hypothalamus. *Regulatory Peptides* 4: 43-48, 1982.

Bugon C, Fellaman D, Gouge A, Cardot J. Corticoliberin in rat brain: immunocytochemical identification and localization of a novel neuroglandular system. *Neuroscience Letters* 30: 25-30, 1982.

Butcher BL, Collins WE. & Fugo N.W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17  $\beta$  throughout the 4-day estrus cycle of the rat. *Endocrinology* 94: 1704-1708, 1974.

Chappel PE, Levine JE. Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. I. Role of hypothalamic progesterone receptors. *Endocrinology* 141: 1477-1485, 2000.

Conneely OM. Perspective: female steroid hormone action. *Endocrinology* 142: 2194-2199, 2001.

Denenberg VH. Critical periods, stimulus input, and emotional reactivity: a theory of infantile stimulation. *Psychological Review* 71: 335-351, 1964.

Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, Martinez-Serrano A, Ojeda SR. Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* 141: 1073-1082, 2000.

Dissen GA, Romero C, Paredes A, Ojeda SR. Neurotrophic control of ovarian development. *Microscopy Research and Technique* 59: 509-515, 2002.

Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL, Lara HE. Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biology of Reproduction* 68: 2038-2043, 2003.

Drouin J, Labrie F. Interactions between  $17\beta$ -estradiol and progesterone in the control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 108: 52-57, 1981.

Francis D, Diodoro J, Laplante P, Weaver S, Seckl JR, Meaney MJ. The role of early environmental events in regulating neuroendocrine development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 20: 136-152, 1996.

Freeman ME. The ovarian cycle of the rat. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed. E. Knobil and J. Neil et al. Raven Press, NY. 45: 613-657, 1994.

Gomes CM, Frantz PJ, Sanvito GL, Anselmo-Franci JA, Lucion AB. Neonatal handling induces anovulatory estrous cycles in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 1239-1242, 1999.

Gomes CM, Rainecki C, Ramos de Paula P, Severino GS, Helena CVV, Anselmo-Franci JA.; Franci CR.; Sanvito GL. Lucion AB.; Neonatal handling and reproductive function in female rats. *Journal of Endocrinology* 184: 435-445, 2005.

González AS, Echandia EL, Cabrera R, Fóscolo MR. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats: II. Effects on estrous cycle in females. *Physiology and Behavior* 86: 591-595, 1994.

González AS, Rodríguez Echandia EL, Cabrera R, Fóscolo MR, Francchia LN. Neonatal chronic stress induces subsensitivity to chronic stress in adult rats. I. Effects on forced swim behavior and endocrine responses. *Physiology and Behavior* 47: 735-74, 1990.

González D, Bellido RA, Garrido-Gracia JC, Hernández G, Alonso R, Sánchez-Criado JE. Luteinizing hormone secretion elicited in a ligand-independent activation of progesterone receptor manner at pituitary level in the rat: differential effect of two selective estrogen receptor modulators. *Neuroscience Letters* 289: 111-114, 2000.

Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin releasing hormone neurons. *Endocrine Reviews* 19: 302-330, 1998.

Hess JL, Denenberg VH, Zarrow MX, Pfeifer WD. Modification of the corticosterone response curve as a function of handling of infancy. *Physiology and Behavior* 4: 109-111, 1969.

Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology* 124: 43-101, 1991.

Hirshfield AN, Midgley ARJ. The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. *Biology of Reproduction* 19: 606-611, 1978.

Ishikawa J. Luteinizing hormone requirements for ovulation in the rat. *Biology of Reproduction* 46: 1144-1150, 1992.

Jonson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428: 145-150, 2004.

Kawata M, Hashimoto K, Takahara J, Sani Y. Immunohistochemical demonstration of corticotropin – releasing factor containing neurons in the hypothalamus of mammals including primates. *Anatomy and Embryology* 165: 303-313, 1982.

Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 141: 1059-1072, 2000.

Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 133: 2690-2695, 1993.

Lara HE, Mcdonald JK, Ojeda SR. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 126: 364-375, 1990.

Lara HE, Porcile A, Espinoza J, Romero C, Luza SM, Fuhrer J, Miranda C, Roblero L. Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine* 15: 187-192, 2001.

Levine S. The psychoendocrinology of stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 697: 61-69, 1993.

Levine S. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences* 746: 275-293, 1994.

Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky P.M. and Meaney M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. *Science* 277: 1659-1662, 1997.

Lucion AB, Cadore LP, Charchat H, Barros HMT, Padoin MJ. Effects of noxious stimulation during the stress-hyporesponsive period on behaviors of pre-puberal and adult male and female rats. *27 th Annual Meeting of the Society for Neuroscience*. October: 25-30, New Orleans, LA, USA, 1081 (Abstract), 1997.

Mahesh VB, Brann DW. Regulation of the preovulatory gonadotropin surge by endogenous steroids. *Steroids* 63: 616-629, 1998.

Matthews MK, Kenyon R. Four-versus five-day estrous cycles in rats: vaginal cycling and pregnancy. *Physiology and Behavior* 33: 65-67, 1984.

Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 138: 3320-3329, 1997.

McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* 21: 200-214, 2000.

Meaney MJ, Aitken DH, Bodnoff SR, Iny LJ, Tatarewics JE, Sapolsky RM. Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behavioral Neuroscience* 99: 765-770, 1985.

Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Larocque S, O'Donnell D, Smythe JW. Environmental regulation of the development of glucocorticoid receptor systems in the rat forebrain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 746: 260-273, 1994.

Meaney MJ, Seema B, Larocque S, McCormick C, Shanks N, Sharma S, Smythe J, Viau V & Plotsky PM. Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Annals of New York Academy of Sciences* 697: 70-85, 1993.

Minegishi T. Regulation of Gonadotropin Receptor in the Ovary. *In: The Ovary*. Leung PCK, Adashi EY. Second Edition. Elsevier Academic Press, 79-92, 2004.

Mistretta CM, Bradley RM. Effects of early sensory experience on brain and behavioral development. *In: Studies on the development of behavior and nervous system*. New York: Academic Press: 215-246, 1978.

Paredes A, Galvez A, Leyton V, Aravena G, Fiedler JL, Bustamante D, Lara HE. Stress promotes development of ovarian cysts in rats: the possible role of sympathetic nerve activation. *Endocrine* 8: 309-315, 1998.

Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research* 18: 195-200, 1993.

Rhees RW, Lephart ED, Eliason D. Effects of maternal separation during postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behavioural Brain Research* 123: 1-10, 2001.

Richards JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological Reviews* 60: 51-89, 1980.

Richards JS. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Molecular Endocrinology* 15: 209-218, 2001.

Romero C, Paredes A, Dissen GA, Ojeda SR. Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 143: 1485-1494, 2002.

Schwartz NB. Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. *In Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Editores: Conn PM, Freeman ME, New Jersey: Human Press, pp. 135-146, 2000.

Sieck G, Ramaley JA. Effects of early handling upon puberty: correlations with adrenal stress responsiveness. *Physiology and Behaviour* 15: 487-489, 1975.

Smith MS, Freeman ME and Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96: 219-226, 1975.

Szawka RE, Anselmo-Franci JA. A secondary surge of prolactin on the estrus afternoon. *Life Sciences* 75: 911-922, 2004.

Tébar M, Uilenbroek JTJ, Kramer P, van Schaik RHN, Wierikx CDJ, Ruiz A, de Jong FH, Sánchez-Criado JE. Effects of progesterone on the secondary surge of follicle-stimulating hormone in the rat. *Biology of Reproduction* 57: 77-84, 1997.

Ward IL. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science* 175: 82-84, 1972.

Ward IL, Ward OB, Winn RJ, Bielawski D. Male and female sexual behavior potential of male rats prenatally exposed to the influence of alcohol, stress or both factors. *Behavior Neuroscience*. 108: 1188-1195, 1994.

Watanabe G, Takya K, Sasamoto F. Dynamics of ovarian inhibin secretion during the estrous cycle of the rat. *Journal of Endocrinology* 126: 151-157, 1990.